

УДК 615.454.811.014.015

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИТОГЕЛЕЙ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

М.А. Огай¹**Э.Ф. Степанова²****Е.Т. Жилиякова³****О.Е. Лебедева³****О.О. Новиков³**¹ Воронежский
государственный университет² Пятигорская
государственная
фармацевтическая академия³ Белгородский государственный
национальный исследовательский
университетe-mail: marinfarm@yandex.ru

Метаболический синдром (МС) является актуальной проблемой современной медицины и фармации. Одним из опасных проявлений МС является синдром диабетической стопы (СДС). Комплексное лечение СДС включает наружные мягкие лекарственные формы – мази, гели, содержащие фитопрепараты разной степени очищенности. Фитопрепараты в данном случае выполняют роль как биодобавок, так и основных действующих компонентов. Разработанные фитогели включали спирто-водные извлечения из зверобоя продырявленного, донника лекарственного, лавра благородного, эхинацеи пурпурной, а также облепиховое масло, настойку прополиса, густой экстракт солодки голой, сок алоэ и таурин. Экспериментально доказана ранозаживляющая активность предложенных составов на крысах, после создания модели аллоксанового сахарного диабета и линейной кожной раны.

Ключевые слова: метаболический синдром, сахарный диабет, таурин.

Введение. Метаболический синдром (МС) относится к наиболее актуальным проблемам современной медицины. МС – комплекс патологий, которые увеличивают риск сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета и его последствий. Характерный для МС «смертельный квартет» проявляется как сочетание сахарного диабета, ожирения, артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца (Д. Kaplan, 1989).

Первичным является нарушение нейроэндокринной функции гипоталамуса вследствие длительных стрессов. В ответ на воздействие стресса повышается секреция и выделение гипофизом адренокортикотропного гормона, который в свою очередь повышает образование гормонов коры надпочечников, что приводит к развитию специфического ожирения с преимущественным отложением жировой ткани в области плечевого пояса, живота, около внутренних органов [7].

Насыщение печени жирами нарушает метаболизм инсулина, а это способствует развитию нарушения толерантности к глюкозе, переходящего в сахарный диабет 2-го типа [4].

Одним из опасных проявлений последствий сахарного диабета является синдром диабетической стопы (СДС). Комплексное лечение СДС включает применение наружных мягких лекарственных форм – мазей, гелей, содержащих фитопрепараты разной степени очищенности. Фитопрепараты в данном случае выполняют роль как биодобавок, так и основных действующих компонентов.

Нами предложены гели на основе лекарственного растительного сырья [1, 2]. За счет многообразия биологически активных веществ (БАВ), содержащихся в растительном сырье, терапевтический эффект суммарных фитопрепаратов складывается из суммы множественных воздействий на организм и функциональные системы.

Методологический подход к комплексному использованию БАВ следующий: включали спирто-водные извлечения из лекарственных растений [3].

Методика эксперимента. Для получения фитогеля 1 к комплексному извлечению из травы зверобоя добавляли облепиховое масло и настойку прополиса в соотношении 5:3:2 и далее вводили в основу, состоящую из сплава полимеров – полиэтиленгликоля 400 (ПЭГ-400) и полиэтиленоксида 1500 (ПЭО-1500).

Для получения фитогеля 2 к комплексному извлечению из травы донника лекарственного, листьев лавра благородного, травы эхинацеи пурпурной добавляли густой экстракт солодки голой, сок алоэ и таурин в соотношении (2:3:1):1:1:2 и далее вво-



дили в основу, состоящую из сплава полимеров – полиэтиленгликоля 400 (ПЭГ-400) и полиэтиленоксида 1500 (ПЭО-1500).

В качестве экстрагента использовали спирто-водную смесь с содержанием этилового спирта 40%. Выбор данного экстрагента основывался на том, что флавоноиды традиционно экстрагируют спиртом этиловым, а сапонины – водой. Поэтому в нашем исследовании мы остановили свой выбор на спиртоводной смеси.

Растительное сырье измельчали до размера частиц 3-5 мм, просеивали через сито и проводили экстракцию 40 % раствором спирта этилового, добавляя последний в соотношении 1:8 (дробная мацерация) в несколько приемов, при этом первая порция составляла 2/3 экстрагента. Получение комплексных извлечений проводили следующим образом. Измельченное сырье загружали в мацерационный бак с механической мешалкой, заливали пятикратным объемом экстрагента (40 % спирт этиловый), с учётом коэффициента поглощения сырья, полученного экспериментальным путём. Экстракция проводилась в течение двух суток при периодическом перемешивании и комнатной температуре, после чего сырье отжимали, фильтровали (Извлечение 1). После этого шрот повторно заливали трехкратным количеством экстрагента, также с учётом коэффициента поглощения сырья. Экстракция проводилась в течение суток при периодическом перемешивании и комнатной температуре, после чего шрот повторно отжимали и фильтровали (Извлечение 2). Периодическая смена экстрагента позволила, при меньшей затрате времени на извлечение, полнее истощить сырье, уменьшить потери при диффузии.

С позиции биофармацевтической концепции создания лекарственных средств одной из важных характеристик любой лекарственной формы является высвобождение, в нашем случае, флавоноидов и сапонинов.

С учетом более близкого к условиям *in vivo* был выбран метод диффузии в агар. В результате было установлено, что наибольшую степень высвобождения обеспечивает мазевая композиция, состоящая из сплава полимеров – ПЭО-1500 и ПЭГ-400.

В реакторе с паровой рубашкой расплавляли тугоплавкий компонент ПЭО-1500, далее вводили ПЭГ-400 и перемешивали.

В реактор-смеситель, при вращающейся со скоростью 30 об/мин. мешалке, подавали необходимое количество расплавленной основы, в которую частями добавляли извлечения. Гомогенизацию гелей проводили с помощью мешалки до получения однородной по всему объему массы в течение 30-40 минут.

Готовые фитогели подвергали анализу на однородность, внешний вид, органолептические свойства, микробиологическую чистоту, качественное и количественное содержание биологически активных веществ.

Изучение ранозаживляющего действия разработанных фитогелей 1 и 2 проводилось на модели линейной кожной раны животных – белых крыс с экспериментальным аллоксановым сахарным диабетом [5, 6]. В эксперименте были использованы белые беспородные крысы обоего пола массой 150-175,0 г. Животные были получены из питомника, прошли двухнедельный карантин и содержались в стандартных условиях вивария. В каждой экспериментальной группе было по шесть животных ($n=6$). Модель сахарного диабета была создана путем внутрибрюшинного введения аллоксана гидрата экспериментальным животным в дозе 170 мг/кг. Диабет развивался на 4-е сутки после введения препарата [6].

На 4-е сутки после внутрибрюшинного введения аллоксана гидрата забирали 1 каплю крови из хвостовой вены и измеряли уровень глюкозы в крови ($20,72 \pm 0,5$ ммоль/л), общего холестерина, триглицеридов, липопротеидов высокой плотности (ЛПВП). Измерение всех перечисленных показателей проводили с помощью портативного биохимического анализатора крови модели CardioChek, используя соответствующие тест-полоски. Затем рассчитывали содержание липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) ммоль/л по формуле:

$$\text{ЛПНП} = \text{Общий холестерин} - \text{ЛПВП} - \text{Триглицериды} / 5.$$

Регистрировали изменение перечисленных выше показателей в сторону увеличения (кроме ЛПВП, уровень которого снижался).



Линейные кожные раны наносили под наркозом – хлоралгидратом (300 мг/кг, внутривенно). Кожу спины разрезали до собственной фасции. Длина разреза составила 25 мм. Затем на равном расстоянии от краев раны накладывали 1 шов, сближающий края раны. Для удобства последующего измерения размеров ран швы накладывались с таким расчетом, чтобы эпителий боковых краев раны не соприкасался, и в этом случае эпителизация происходила от конечных краев раны.

Оценку ранозаживляющего действия проводили по характеру клинического течения (наличия нагноения, времени полного отторжения струпа, времени и динамике полного срастания краев раны) на 5, 10, 15, 20 и 25-е дни наблюдения. Степень уменьшения линейного размера раны определяли с помощью миллиметровой бумаги.

Исследуемый объект наносили на раны животным – первую группу животных не лечили (контроль), второй группе животных ежедневно на раневую поверхность наносили левомеколь (препарат сравнения), третьей группе животных – фитогель 1, четвертой группе животных – фитогель 2. Все препараты наносили на протяжении всего периода эксперимента до полного заживления ран.

Тензиометрическое исследование прочности образовавшегося рубца характеризует способность клеток к регенерации после патологического линейного кожного разреза. Животных наркотизировали хлоралгидратом (300 мг/кг) и вырезали кусочки кожи с зажившими ранами шириной 1 см и длиной 3 см, фиксировали одним концом в верхней точке с помощью специального зажима, а к нижнему концу кусочка подвешивали другой зажим с площадкой для установки гирь, массу которых постепенно увеличивали до получения разрыва рубца. Большая масса, необходимая для разрыва рубца, свидетельствовала о большей его прочности.

Изучали срезы линейных кожных ран гистологически. Образцы кожи брали таким образом, чтобы в поле зрения попадал как участок поврежденной кожи, так и соседний неповрежденный участок. Эти участки рассматривались как интактные для сравнения с поврежденными.

Статистическая обработка результатов исследований проводилась на ПЭВМ типа ВМ РС/АТ Ре с использованием пакета прикладных программ. Проверка гипотезы о нормальности распределения вариационных рядов полученных данных осуществлялась при помощи критерия хи-квадрат (χ^2) Пирсона на уровне значимости $\alpha=0,05$. Статистическая достоверность изменений оценивалась с использованием теста Стьюдента для непарных выборок.

Результаты исследования и обсуждение.

Фитогель 1 представлял собой однородную массу желто-оранжевого цвета, с характерным запахом облепихового масла и прополиса.

Фитогель 2 представлял собой массу светло-желтого цвета, мягкой консистенции, с характерным запахом лавра благородного и алоэ древовидного.

Влияние разработанных фитогелей 1 и 2 на время заживления линейной кожной раны у крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом представлено в табл. 1.

К пятому дню эксперимента левомеколь наиболее активен.

Эта тенденция сохранялась к десятому дню эксперимента. Размер линейной кожной раны у животных с экспериментальным аллоксановым диабетом леченных левомеколем в среднем составило 6,50 мм (меньше, чем в контроле, на 15,25%).

Однако к пятнадцатому дню эксперимента исследуемые фитогели 1 и 2 заметно превосходят препарат сравнения на 53,08 и 48,68% соответственно.

Полное заживление линейных кожных ран наблюдали во всех трех экспериментальных группах к двадцать пятому дню эксперимента, за исключением контрольной группы, где М составило в среднем 1,30 мм (см. табл. 1).



Таблица 1

Влияние разработанных фитогелей 1 и 2 на время заживления линейной кожной раны у крыс с экспериментальным аллоксановым сахарным диабетом, мм

Исследуемый объект	Средний линейный размер раны, мм. М ± m					
	исходный	на 5 день	на 10 день	на 15 день	на 20 день	на 25 день
Контроль, n=6	26,17±1,47	19,0±1,41	7,67±0,82	3,67±0,41	3,00±0,32	1,30±0,23
Левомеколь, n=6	24,50±1,05	17,83±0,75 p=0,104784 (p≥0,05)	6,50±0,84 p=0,0345813 (p≤0,05*)	3,41±0,38 p=0,295937 (p≥0,05)	2,08±0,49 p=0,00325781 (p≤0,05*)	0
Фитогель 1, n=6	25,50±0,45	18,50±0,45 p=0,428221 (p≥0,05) p1=0,0917572 (p1≥0,05)	7,50±0,45 p=0,670325 (p≥0,05) p1=0,0273229 (p1≤0,05*)	1,60±0,09 p=2,67542E-7 (p≤0,05*) p1=4,3463E-7 (p1≤0,05*)	1,25±0,22 p=6,22511E-7 (p≤0,05*) p1=3,60406E-3 (p1≥0,05)	0
Фитогель 2, n=6	24,50±0,45	19,50±0,45 p=0,428221 (p≥0,05) p1=8,90884E-4 (p1≤0,05*)	8,50±0,45 p=0,530978 (p≥0,05) p1=4,22E-4 (p1≤0,05*)	1,75 ±0,22 p=1,46926E-6 (p≤0,05*) p1=3,00449E-6 (p1≤0,05*)	1,55±0,05 p=5,9542E-7 (p≤0,05*) p1=2,44584E-3 (p1≤0,05*)	0

Примечание: p – достоверность различий по отношению к контролю;
p1 – достоверность различий по отношению к препарату сравнения – левомеколю;
* – различия достоверные.

Таблица 2

Тензиометрическое изучение прочности сформировавшегося рубца после линейной кожной раны у крыс с экспериментальным аллоксановым сахарным диабетом

Исследуемый объект	Прочность сформировавшегося рубца, г. М ± m
Контроль, n=6	233,00±3,16
Левомеколь, n=6	291,50±3,86 p=6,10643E-11 (p≤0,05*)
Фитогель 1, n=6	260,27±5,70 p=0,00000127086 (p≤0,05*) p1=5,98976E-7 (p≤0,05*)
Фитогель 2, n=6	290,32±1,58 p=2,43805E-12 (p≤0,05*) p1=0,502786 (p≥0,05)

Примечание: p – достоверность различий по отношению к контролю;
p1 – достоверность различий по отношению к препарату сравнения – левомеколю;
* – различия достоверные.

Тензиометрическое изучение прочности сформировавшегося рубца показало, что в группах животных с экспериментальным аллоксановым диабетом разрыв рубца в контрольной группе возникал при нагрузке 233,00 г. В группе, получавшей левомеколь, рубец выдерживал нагрузку 291,50 г.

Фитогель 1 несколько уступает препарату сравнения – левомеколю. Разрыв рубца, сформировавшийся под воздействием фитогеля 1, возникал при нагрузке 260,27 г. Фитогель 2 обладает соизмеримым эффектом с левомеколем, и разрыв рубца возникал при нагрузке 290,32 г.

Гистологические исследования срезов линейных кожных ран. Образцы с участком поврежденным и соседним неповрежденным участком подвергали гистологическим исследованиям.

Группа 1. Контроль.

При гистологическом исследовании в данной группе заживление раны происходило вторичным натяжением. Дефект раны заполнен грануляционной тканью, в ко-

торой преобладают клеточные элементы соединительной ткани. Просматриваются образовавшиеся сосуды, изнутри покрытые эндотелием. С краев раны наблюдается незавершенная эпителизация. Под срастающимся эпителием видна незавершенная грануляционная полость, частично заполненная остатками некротизированной ткани (указано стрелкой). Слои горизонтально расположенных фибробластов и коллагеновых волокон не сформированы, что говорит о вяло текущем процессе заживления раны (рис. 1).

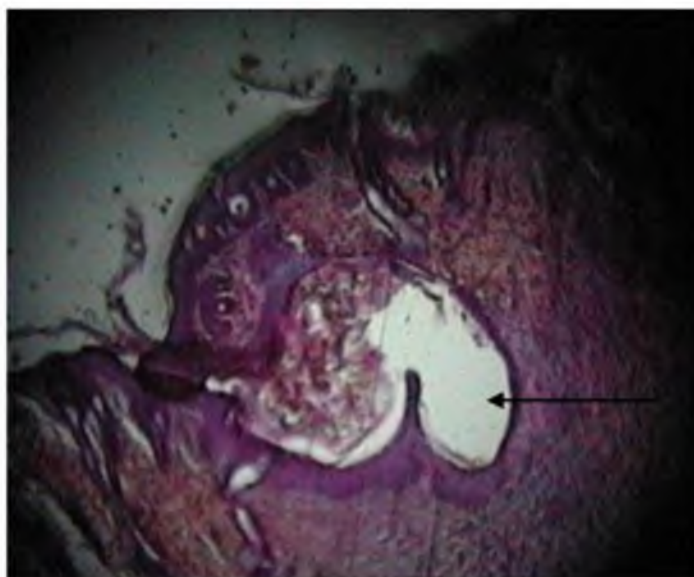


Рис. 1. Фотография гистологического среза линейной кожной раны контрольной группы животных. Стрелкой указаны остатки некротизированной ткани

Группа 2. Левомеколь

При гистологическом исследовании в данной группе эпителизация раневой поверхности полностью завершена. Струп на поверхности рубца отсутствует. Поверхностного лейкоцитарно-некротического слоя нет. Сформировавшийся рубец широкий, в нем преобладают клеточные элементы соединительной ткани. Просматривается небольшое количество сосудистого компонента грануляционной ткани, находящегося в стадии инволюции. Прорастание снизу коллагеновых волокон выражено слабо (рис. 2).

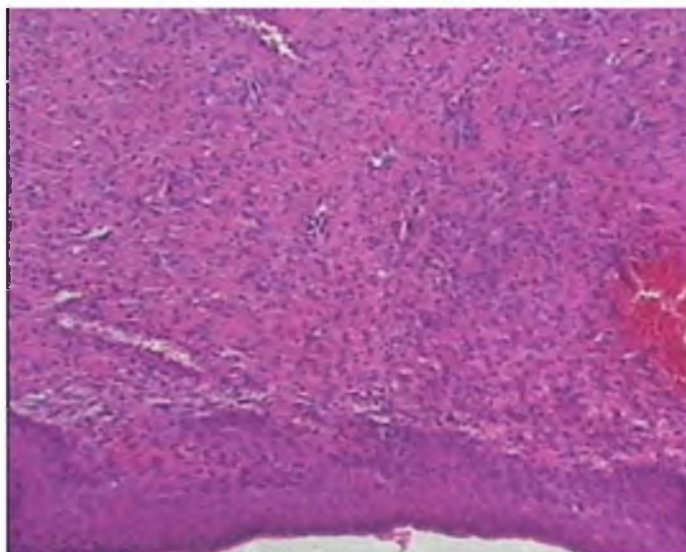


Рис. 2. Фотография гистологического среза линейной кожной раны группы животных, леченных препаратом сравнения – Левомеколем

Группа 3. Фитогель 1

На гистологических срезах кожи спины данной группы крыс срастание эпителия произошло, однако над поверхностью рубца располагается незарубцевавшаяся полость (указано стрелкой), наличие которой говорит о неполном завершении регенерации раневого дефекта. Собственно грануляционная ткань состоит преимущественно из клеточных элементов соединительной ткани. Выражен сосудистый компонент грануляции, свидетельствующий о незрелости регенерата (рис. 3).

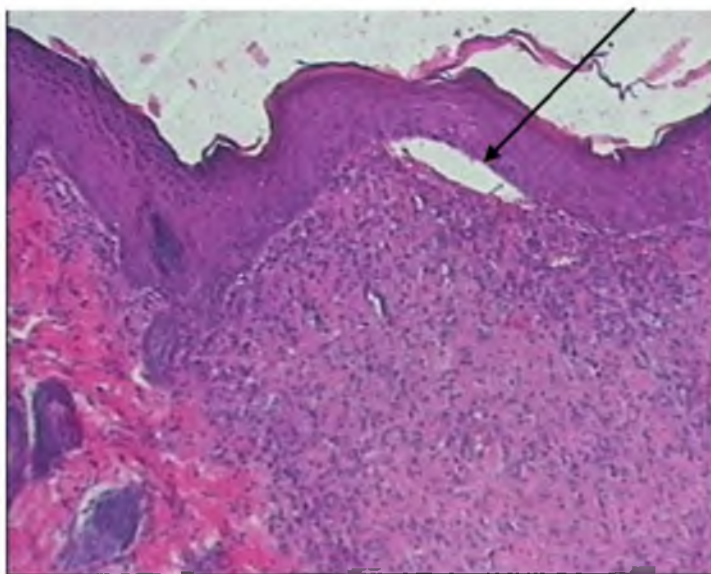


Рис. 3. Фотография гистологического среза линейной кожной раны группы животных, леченных Фитогелем 1. Стрелкой указаны остатки незарубцевавшей полости

Группа 4. Фитогель 2

В данной группе животных поверхность рубца полностью покрыта эпидермисом. Под эпидермисом сформировались продольные пласты, выполненные тяжами фибробластов. Глубокий слой рубца состоит преимущественно из волокнистых элементов – коллагеновых и эластических волокон, постепенно вытесняющих клеточный компонент. Определяется небольшое количество сосудов в стадии инволюции (рис. 4).

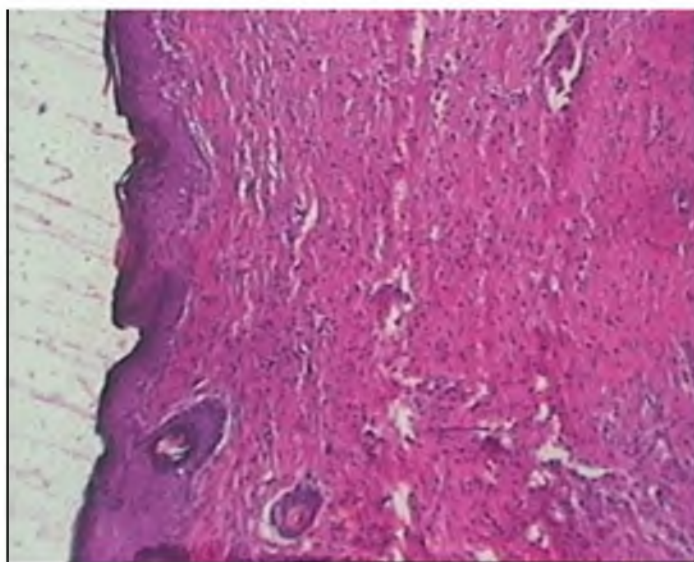


Рис. 4. Фотография гистологического среза линейной кожной раны группы животных, леченных Фитогелем 2



Выводы. Разработаны фитогели ранозаживляющего действия, что доказано на модели линейной кожной раны у животных с экспериментальным аллоксановым сахарным диабетом. Тензиометрические и гистологические исследования подтверждают прочность и зрелость образовавшегося рубца. Вышеизложенное позволяет в перспективе рассматривать фитогели для профилактики и лечения некоторых последствий метаболического синдрома.

Литература

1. Асеева, Т. А. Сахароснижающие средства растительного происхождения / Т.А. Асеева, С.М. Николаев и др. // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения : материалы 3-го междунар. съезда. 29 июня – 1 июля. – СПб, 1999. – С. 13-16.
2. Ашаева, Л. А. Изучение сахароснижающего действия листьев лавра благородного / Л.А. Ашаева, А.И. Анчикова, Н.А. Алханова и др. // Фармация. – 1984. – Т. 12, № 2. – С. 49-51.
3. Каухова, И. Е. Теоретические и экспериментальные основы разработки эффективных ресурсосберегающих технологий лекарственных средств растительного происхождения: автореф. дис. ... д-ра фарм. наук / И.Е. Каухова. – СПб., 2007. – 59 с.
4. Мычка, В. Б. Акарбоза – средство профилактики множественных сердечно-сосудистых факторов риска метаболического синдрома / В.Б. Мычка, Р.М. Богиева, И.Е. Чазова // Клинич. фармакология и терапия. – 2003. – № 12(2). – С. 80-83.
5. Сернов, Л. Н. Элементы экспериментальной фармакологии / Л.Н. Сернов, В.В. Гацура. – М., – 2000. – 351 с.
6. Экспериментальный сахарный диабет / Под ред. В.Г. Баранова. – Л. : Наука, 1983. – 37 с.
7. Чазова, И. Е. Метаболический синдром / И.Е. Чазова, В.Б. Мычка // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2003. – № 3. – С. 32-38.

TECHNOLOGICAL ASPECTS OF RECEPTION AND PHARMACOLOGICAL RESEARCH OF PHYTOGELS FOR CORRECTION OF CONSEQUENCES OF THE METADOLIC SYNDROME

M.A. Ogaj¹
E.F. Stepanova²
E.T. Zhiljakova³
O.E. Lebedeva³
O.O. Novikov³

¹*Voronezh state university*

²*Pyatigorsk state pharmaceutical academy*

³*Belgorod National Research University*

e-mail: marinfarm@yandex.ru

The metabolic syndrome (MS) is actual problem of modern medicine and pharmacy. One of dangerous signes of MS is the syndrome of diabetic foot (SDS). Complex treatment of SDS includes external soft medicinal forms – ointments and gels, containing phytopreparations of different degree of purification. Phytopreparations in this case carry out a role of bioadditives, and the basic active components. The developed phytogels included spiritus and water extraction from hypericum perforatum, melilotus officinalis, laurus nobilis, echinacea purpurea, and also Hippophaë rhamnoides oil, tincture of propolis, a dense extract glycyrrhiza glabra, juice of an aloe vera and taurine. It is experimentally proved the wound healing of the above mentioned complexes at rats on the model of alloxane diabetes mellitus and linear wound of skin.

Keywords: a metabolic syndrome, diabetes mellitus, taurine.